



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication : **0 503 991 A1**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt : **92400505.1**

(51) Int. Cl.⁵ : **C07K 3/28, C07K 13/00,
// A61K37/02**

(22) Date de dépôt : **27.02.92**

(30) Priorité : **08.03.91 FR 9102804**

(43) Date de publication de la demande :
16.09.92 Bulletin 92/38

(84) Etats contractants désignés :
CH DE DK ES FR GB GR LI LU MC NL PT SE

(71) Demandeur : **CENTRE REGIONAL DE
TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE
19-21 rue Camille Guérin
F-59012 Lille (FR)**

(72) Inventeur : **Burnouf-Radosevich, Miryana
5 rue du Dr Schaffner
F-59136 Wavrin (FR)
Inventeur : Burnouf, Thierry
5 rue du Dr Schaffner
F-59136 Wavrin (FR)**

(74) Mandataire : **Lepeudry-Gautherat, Thérèse et
al
CABINET LEPEUDRY, 52, avenue Daumesnil
F-75012 Paris (FR)**

(54) Procédé de préparation à l'échelle industrielle d'un concentré de facteur von Willebrand humain standardisé, de très haute pureté, approprié à un usage thérapeutique.

(57) L'invention concerne un procédé de préparation de facteur von Willebrand humain à partir d'une fraction cryoprécipitée de plasma.

Le procédé comprend une combinaison de trois étapes de séparation chromatographique. Le concentré obtenu présente une très haute activité spécifique et un pourcentage élevé de multimères de haut poids moléculaire.

Le concentré est destiné notamment à un usage thérapeutique.

EP 0 503 991 A1

L'invention concerne un procédé de préparation à l'échelle industrielle d'un concentré de facteur von Willebrand humain, standardisé, de grande pureté, à très haute activité spécifique et présentant un taux élevé de multimères de haut poids moléculaire, destiné notamment à un usage thérapeutique.

Le facteur von Willebrand (fvW) est la plus grande molécule connue en circulation dans le plasma. Il est constitué d'un ensemble de multimères liés par des ponts S-S, dont l'élément de base a un poids moléculaire voisin de 260 kilodaltons (kDa). La plus petite forme de fvW, dans le plasma, est un dimère de 440-500 kDa et les formes les plus grandes sont des multimères de ce dimère dont le poids moléculaire peut atteindre 20 millions de daltons. Cet assemblage des sous-unités en multimères peut être spécifique des cellules dans lesquelles il est opéré, le fvW étant synthétisé et polymérisé dans les mégacaryocytes et dans les cellules endothéliales.

Ce facteur joue un rôle essentiel dans l'hémostase par deux fonctions distinctes : comme protéine d'adhésion il permet la dispersion, l'adhérence et l'aggrégation des plaquettes sanguines sur le sous-endothélium vasculaire (et participe ainsi au processus de cicatrisation rapide des vaisseaux lésés) et, d'autre part, il assure la stabilisation et le transport du Facteur VIII dans la circulation sanguine.

Une déficience congénitale en fvW ou une anomalie structurale de ce facteur entraîne la maladie de Willebrand qui se manifeste par des hémorragies surtout cutanées et des muqueuses. Cette maladie est très hétérogène dans son expression clinique et pose de graves problèmes en cas d'intervention chirurgicale. Le traitement de la maladie de Willebrand s'impose pour corriger les anomalies de l'hémostase primaire (temps de saignement) et de la coagulation (temps de céphaline activée et activité coagulante du Facteur VIII).

La maladie se traite par thérapie de substitution par des dérivés de plasma humain enrichis en fvW (par exemple la fraction cryoprécipitée du plasma ou des concentrés de Facteur VIII contenant suffisamment de fvW associé à celui-ci). Cependant ces produits ne sont pas standardisés en vue du traitement de la maladie de Willebrand. De plus les fractions peu purifiées de plasma sanguin, en particulier le cryoprécipité, ne sont pas exemptes de risques de contamination virale parce qu'elles ne sont souvent pas soumises à un traitement efficace d'inactivation virale. En outre, elles entraînent une surcharge en protéines contaminantes dont le patient n'a pas besoin et qui peuvent entraîner des réactions immunologiques après des injections multiples.

Le Facteur VIII purifié, au contraire, peut être soumis à un traitement d'inactivation virale efficace mais son procédé de purification a été optimisé en vue du traitement de l'hémophilie A et non en vue du traitement de la déficience en fvW.

Ainsi les procédés de préparation du Facteur VIII récemment mis au point, comme l'immunoaffinité et la purification par échange d'ions, sont de plus en plus performants et produisent des concentrés qui ne contiennent plus suffisamment de fvW pour être efficaces dans le traitement de la maladie de Willebrand.

C'est pour combler ce besoin d'un traitement efficace pour la maladie de Willebrand que la Demanderesse a mis au point un nouveau procédé de purification du fvW à l'échelle industrielle, qui permet de rentabiliser au mieux l'extraction de diverses molécules plasmatiques. En particulier il permet, dans une première étape, la préparation d'un concentré de Facteur VIII (selon un procédé décrit dans la demande de brevet européen 0 359 593) et, ultérieurement, la récupération d'une fraction enrichie en facteur von Willebrand, à partir du même lot de cryoprécipité, ce qui permet de rentabiliser au mieux l'utilisation du plasma humain. La fraction de fvW ainsi obtenue est ensuite purifiée par deux étapes de chromatographie supplémentaires ce qui aboutit à un concentré de fvW de très haute pureté.

La complexité de la molécule du facteur von Willebrand rend sa préparation très difficile. Des méthodes de purification à petite échelle, c'est-à-dire de 5 à 2000 ml, dans des buts d'étude analytique ont déjà été décrites mais ces méthodes n'ont pas pu être adaptées à l'échelle industrielle (Thorell et al. Thromb Res. 35, 1984, 431-450). De plus, le principe de rentabilisation maximale du cryoprécipité pour produire à la fois du FVIII et du fvW n'avait pas encore été envisagé.

Le facteur von Willebrand a été purifié par solubilité différentielle sur des composés sulfatés, en présence de glycine (Berntorp et al. Vox Sang. 56, 1989, 212-217 ; Winkelman et al. Vox Sang. 57, 1989, 97-103) et par différentes méthodes de séparations chromatographiques, par tamisage moléculaire (Perret et al. Haemostasis 14, 1984, 289-295) ou par échange d'ions (Austen et al. Thromb Haemostas. 48, 1982, 46-48 ; Harrison et al. Thromb. Res. 50, 1988, 295-304), mais ces techniques montrent d'assez faibles rendements en facteur von Willebrand ou une faible capacité du gel ou ne permettent pas la récupération simultanée du FVIII et du fvW, ce qui les rendent moins intéressantes pour une application industrielle.

Austen et al. (1982, déjà cité) obtiennent un concentré de faible pureté (8 U Ag/mg protéine) et avec un rendement assez faible, probablement dû à leurs conditions de chromatographie très drastiques (pH 5,5).

Harrison et al. (1988, déjà cité) utilisent comme matrice du dextran-sulfate-sépharos ; ce matériau n'a qu'une faible capacité de rétention du fvW et le fvW ainsi produit n'a qu'une activité spécifique de 2-4 U/mg protéine.

De plus la plupart de ces produits contiennent une proportion importante de formes dénaturées ou inactives.

ves, à côté des formes multimériques actives, comme l'indique le rapport activité cofacteur d ristocétine (RCo)/antigène qui est d l'ordre d 0,08 à 0,8 (Lawrie et al. Br. J. Haematol. 1989, 73,100), ce qui les rend moins efficaces pour un usage thérapeutique dans la maladie de Willebrand. Au contraire, le procédé de la Demanderesse permet d'obtenir un concentré d fvW dont le rapport RCo/Ag est supérieur à un, ce qui est comparable à celui du fvW natif, dans le pool de plasma.

La présente invention concerne un procédé de préparation de concentré de facteur von Willebrand à usage thérapeutique, ledit procédé permettant de préparer des lots standardisés dérivant chacun de très grands volumes de plasma (4000 litres ou plus), à partir desquels on a déjà récupéré du concentré de FVIII, ce qui rentabilise au mieux l'utilisation du cryoprécipité.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un concentré de facteur von Willebrand qui comprend la combinaison de trois étapes successives de chromatographie permettant un enrichissement en multimères de haut poids moléculaire, associés à l'activité biologique du fvW. Le matériau de départ est la fraction cryoprécipitée du plasma humain, soumise à une étape classique de prépurification par adsorption sur hydroxyde d'aluminium. Ce matériau est ensuite soumis à une inactivation virale, par exemple par un traitement par solvant-détergent, avant sa purification.

Le procédé de purification selon la présente invention comprend une combinaison de trois étapes successives de chromatographie d'un sous-produit de la production du FVIII, les deux premières étant des chromatographies d'échanges d'ions et la troisième étant une chromatographie d'affinité.

Les deux chromatographies d'échanges d'ions sont effectuées sur la même résine de polymère vinylique greffé de groupements DEAE (diéthylaminoéthyl), plus particulièrement sur des colonnes de DEAE-Fractogel^(M) TSK 650 (Merck), équilibrées avec du tampon comprenant du citrate trisodique 0,01 M, du chlorure de sodium 0,11 M, du chlorure de calcium 0,001 M, de la glycine 0,12 M et de la lysine 0,016 M, à pH7.

Le DEAE-Fractogel^(M) TSK 650 est un gel synthétique hydrophile. Le support est un copolymère d'oligoéthylèneglycol, de glycidinéméthacrylate et de pentaérythritol-diméthacrylate sur lequel sont greffés des groupements diéthylaminoéthyl comme $-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2HC1$, ce qui constitue un échangeur d'anions faiblement alcalin. Le DEAE-Fractogel TSK 650 est disponible sous deux tailles de particules (après réhydratation) : le type S (0,025-0,050 mm) et le type M (0,045 - 0,090 mm) ; les deux types peuvent être utilisés pour la présente invention.

La fraction cryoprécipitée du plasma, prépurifiée et ayant subi un traitement d'inactivation virale, est appliquée sur la première colonne de chromatographie qui retient une grande partie du facteur von Willebrand. Celui-ci est ensuite élué par une augmentation de la concentration de chlorure de sodium du tampon à 0,14 - 0,15 M.

La fraction ainsi éluée, enrichie en facteur von Willebrand, est appliquée sur la deuxième colonne de chromatographie, dans les mêmes conditions que sur la première. La fraction injectée sur cette deuxième colonne étant déjà débarrassée de beaucoup de protéines (surtout le FVIII et la fibronectine), qui entraînent en compétition pour les sites d'adsorption, la capacité d'adsorption du fvW sur la deuxième colonne est beaucoup plus grande. Après élimination du filtrat et rinçage de la colonne avec le tampon d'équilibrage, le fvW adsorbé est élué par une augmentation de la concentration de chlorure de sodium du tampon à 0,15 - 0,17 M.

Grâce à la grande capacité d'adsorption et à l'efficacité de la résine de DEAE-Fractogel vis-à-vis du fvW, celui-ci est récupéré avec une haute activité spécifique (> 150 U RCo/ml) ce qui permet d'éviter une étape supplémentaire de concentration par ultrafiltration.

La fraction ainsi éluée est soumise à une chromatographie d'affinité sur colonne de gélatine- sépharose, dans le même tampon d'équilibrage, ce qui permet d'éviter une étape de dialyse ou d'ultrafiltration pour modifier la concentration saline ; cette colonne retient les molécules de fibronectine résiduelle qui contaminaient encore le fvW. Le choix du gel associé à la gélatine n'est pas critique : on peut également utiliser de la gélatine- Ultrogel^(M), de la gélatine-Spheredex^(M) ou de la gélatine- Fractogel^(M). On utilise de préférence de la gélatine- sépharose^(M), qui fixe jusqu'à 5-10 mg de fibronectine/ml dans les conditions utilisées dans le procédé selon l'invention.

Le facteur von Willebrand purifié dans ces conditions ne se lie pas au gel et passe dans le filtrat ; comme l'étape de chromatographie en présence de gélatine n'implique pas de dilution importante du fvW, il n'est pas nécessaire de le concentrer (par exemple par ultrafiltration) et il peut être directement conditionné et lyophilisé. L'absence d'enzymes protéolytiques dans le produit final assure sa stabilité au cours de la filtration stérilisante et de la lyophilisation ce qui évite l'addition d'agents stabilisants.

Le concentré de facteur von Willebrand obtenu par le procédé selon la présente invention présente un taux de purification exceptionnellement élevé de $> 10\ 000$ fois par rapport au plasma de départ : sa spécificité est de 345 U CBA/mg de protéines (unités de mesure de l'activité de liaison du collagène) et de > 100 U RCo/mg de protéines (unités d'activité de cofacteur de ristocétine). Le rôle de chaque étape de chromatographie dans la purification du fvW est illustré par la figure 1.

L'amélioration de la qualité du produit au cours des étapes successives de purification a été surveillée tout particulièrement en fonction de la proportion des molécules à l'état de multimères de haut poids moléculaire (c'est-à-dire des formes moléculaires à haute activité biologique) par analyse électrophorétique.

Cette analyse révèle un enrichissement progressif en multimères > 4 (Figure 2) qui représentent 79% du fvW dans la préparation finale, par rapport à 70% dans le plasma natif et alors que la cryoprécipitation en fait perdre la moitié. De manière inattendue, c'est la chromatographie sur DEAE-FractogelTM qui favorise cette rétention sélective des multimères de très grande taille et élimine dans le filtrat les formes de petite taille, de structure anormale (ayant subi une protéolyse partielle) et de faible activité.

Le concentré de fvW standardisé de grande pureté à haute activité spécifique et à haute teneur en multimères de haut poids moléculaire, obtenu par le procédé selon la présente invention est donc particulièrement bien adapté à un usage thérapeutique dans les différentes formes de la maladie de Willebrand, ce qui est confirmé par des études cliniques préliminaires. Celles-ci montrent, en particulier, que le concentré de fvW raccourcit efficacement le temps de saignement au cours des hémorragies.

Des tests in vitro ont confirmé l'identité de ses propriétés biochimiques et physiologiques avec celles de la molécule native, en particulier, -sa capacité de fixer les plaquettes sanguines dans un dispositif de perfusion, et -sa capacité de se lier au Facteur VIII endogène.

La haute pureté du concentré de facteur von Willebrand obtenue par le procédé selon la présente invention permet également d'envisager son application dans divers usages de laboratoire (d'analyse fine de structure, d'étude de fonctionnalité, de diagnostic...) et de production d'anticorps spécifiques.

Le concentré selon la présente invention peut également être utilisé comme stabilisant au cours de la production du Facteur VIII par des cellules transformées par génie génétique et au cours des étapes de purification du Facteur VIII ainsi produit.

L'exemple suivant illustre un mode de réalisation de la présente invention sans toutefois en limiter la portée.

25 EXEMPLE

- Matériau de départ.

Le cryoprécipité est préparé à partir de plasma frais récolté en présence de citrate de sodium (4%) ou de solution anticoagulante CPD (citrate, phosphate, dextrose), et congelé au plus tard 6 heures après son prélèvement. Le plasma est congelé à -60°C puis conservé à -35°C. Les lots de plasma contiennent de 1800 à 2000 litres et sont rassemblés par lots de 4000 litres pour chaque mise en œuvre du procédé. En vue de la décongélation, le plasma est placé dans une chambre à -7°C pendant au moins 12 heures pour assurer un réchauffement lent et régulier puis il est dégelé dans une enceinte thermostatée à 0 - 2°C, sous agitation constante. Le cryoprécipité (qui représente environ 9 g/litre de plasma) est récupéré par centrifugation à froid.

Après centrifugation, le cryoprécipité récupéré est remis en solution et adsorbé sur hydroxyde d'aluminium pour éliminer les principaux contaminants, c'est-à-dire les composants du complexe prothrombinique (particulièrement le Facteur VII), le Facteur XII. Le surnageant est ensuite refroidi à 15°C (ce qui élimine en partie le fibrinogène et la fibronectine).

Ce traitement permet une récupération de 80 à 86% du mélange Facteur VIII - facteur von Willebrand du cryoprécipité ; l'activité spécifique du Facteur VIII est de 0,7 UI/mg et celle du fvW de 0,6 U RCo/mg (activité cofacteur de ristocétine) et de 1,2 U CBA/mg (activité de liaison du collagène).

- Traitement d'inactivation virale.

La solution contenant le Facteur VIII - facteur von Willebrand est soumise à un traitement par solvant-détergent connu pour son efficacité contre les virus à enveloppe lipidique (Horowitz et al., 1985, Transfusion, 25, 516-522.) et qui comprend une incubation de 8 heures à 25°C en présence de 0,3 % tri-n-butyl phosphate (TnBP) et de 1% de Tween 80.

Après ce traitement on retrouve 95% de l'activité des Facteurs VIII et von Willebrand mesurée à l'étape précédente. L'électrophorèse permet de contrôler que le fvW est toujours sous forme multimérique.

- Procédé de séparation chromatographique.

La purification du facteur von Willebrand apparaît comme une dérivation du procédé de purification du Facteur VIII décrit par la Demanderesse dans la demande de brevet européen 0 359 593.

La première chromatographie est réalisée sur une colonne de DEAE-FractogelTM TSK 650 (Merk). Le tampon d'équilibrage contient du citrate trisodique (0,01 M), du chlorure de calcium (0,001 M), du chlorure de sodium (0,11 M), de la glycine (0,12 M) et de la L-lysine (0,016 M). Le facteur von Willebrand, le Facteur VIII et la fibronectine sont retenus par la colonne ; les protéines contaminantes (principalement le fibrinogène et des IgG) faiblement ou pas fixées par la colonne et les résidus du traitement d'inactivation virale sont éliminés par plusieurs lavages successifs avec le même tampon.

La colonne est utilisée avec une vitesse de flux linéaire de 100 cm/hure.

Dans ces conditions d'utilisation, la colonne utilisée présente une capacité de rétention du fvW de environ 75% (mesurés sous forme d'antigène, Ag), le rest étant perdu dans le filtrat. Cette capacité de fixation correspond à 45 U d'Ag fvW/ml de gel.

Le facteur von Willebrand est désorbé de la colonne par une augmentation de la concentration en NaCl du tampon à 0,15M. La fraction de fvW récoltée contient 30 à 35 % du fvW initial mais 40 % de celui-ci reste co-adsorbé avec le Facteur VIII et sera co-élué avec celui-ci par une seconde augmentation de la concentration du tampon à 0,25 M et sera co-purifié avec celui-ci.

La fraction contenant le fvW élué de cette première colonne est réinjectée sur une seconde colonne, identique à la première et dans les mêmes conditions, après une légère dilution avec le tampon d'équilibrage, pour ajuster la force ionique de la fraction fvW à l'équivalent de 0,11 M en chlorure de sodium.

La fraction injectée étant déjà débarrassée de contaminants et du Facteur VIII qui entraînent en compétition pour la capacité de fixation des sites d'absorption de la première colonne, on observe pour la seconde, une capacité de fixation beaucoup plus grande, de 320 U d'Ag fvW/ml de gel.

Le fvW est désorbé par une augmentation de la concentration en NaCl du tampon à 0,17 M.

Cette deuxième chromatographie permet un facteur de concentration de 8 à 10 fois par rapport à la précédente ce qui évite des étapes supplémentaires de concentration par ultrafiltration, par exemple. Dans les différents systèmes de mesure habituels, l'éluat contient les taux ou activités de fvW suivants :

20	- antigène (Ag)	88 ± 9 U/ml
	- cofacteur de ristocétine :	97 ± 19 U/ml
	- capacité de fixation au collagène (CBA) :	149 ± 13 U/ml.
25	- multimères (≥ 4) de haut poids moléculaire	79%

Le rapport CBA/Ag de 1,69 montre que l'activité du fvW est bien préservée. Ceci est en accord avec le haut pourcentage (79%) de multimères de haut poids moléculaire.

L'analyse électrophorétique de cet éluat du fvW révèle la présence d'une légère contamination par de la fibronectine et de l'inter-alpha trypsine inhibiteur (ITI).

Ce second éluat de fvW est soumis à une troisième étape de purification sur colonne de gélatine-Sepharose CL4B (Pharmacia) équilibrée avec le tampon d'éluion de la colonne précédente, pour éliminer la fibronectine.

Ce gel de chromatographie d'affinité a une capacité de rétention de la fibronectine de > 5 mg/ml ce qui permet de réduire ce contaminant à des quantités indétectables (< 4 mg/l) dans la fraction fvW.

Le fvW purifié se retrouve dans le filtrat de cette dernière étape et peut être directement conditionné et lyophilisé.

40 - l'analyse électrophorétique ne détecte plus aucun contaminant,
- le contenu en fvW est de 205 U Ag/mg protéine,
- son activité spécifique est de 345 U CBA/mg de protéine
et 186-220 U RCo/mg de protéine.

Le degré total de purification par rapport au plasma initial est de > 10 000 fois.

45 Le fvW obtenu en fin de purification est constitué à 65 à 80 % de multimères de haut poids moléculaire, c'est-à-dire un taux comparable à celui du plasma de départ qui est de 70 %, comme le montre l'analyse électrophorétique sur agarose-SDS.

La stabilité du concentré a été étudiée à l'état liquide à température ordinaire pendant 24 heures : on ne détecte aucune trace de protéolyse ni de changement d'activité spécifique.

50 L'absence totale d'activité thrombogène du concentré a été contrôlée par les tests classiques de NAPTT ("non activated partial thromboplastin time"). L'absence totale de thrombine, de PKA et de kallikréine a été démontrée.

Le concentré final obtenu ne nécessite aucune addition de stabilisant.

55 Figure 1 :

SDS-PAGE des fractions de fvW au cours de la purification. bande 1 : cryoprécipité ; bande 2 : cryoprécipité traité au solvant-détergent ; bande 3 : fraction non liée au DEAE-Fractogel ; bande 4 : 1er éluat de fvW ;

bande 5 : 2^e éluat de fvW ; bande 6 : fraction non liée au gel à la gélatine ; bande 7 : standards.

Fbn = fibronectin

IgG = immunoglobulines

Alb = albumine

Figure 2 :

Distribution des multimères du fvW dans les fractions en cours de purification, après électrophorèse sur agarose-SDS.

bande 1 : plasma natif ; bande 2 : cryoprécipité ; bande 3 : cryoprécipité traité au solvant-détergent ; bande 4 : fraction non liée au DEAE-Fractogel ; bande 5 : 1^{er} éluat de fvW ; bande 6 : 2^e éluat de fvW ; bande 7 : fraction non liée au gel à la gélatine.

Revendications

1.- Procédé de préparation d'un concentré du facteur von Willebrand humain standardisé, à partir d'une fraction cryoprécipitée de plasma, prépurifiée sur hydroxyde d'aluminium, caractérisé en ce qu'il comprend une combinaison de trois étapes successives de séparation chromatographique, les deux premières étant des chromatographies d'échange d'ions sur une résine de type polymère vinylique à larges pores portant des groupements DEAE et la troisième étant une chromatographie d'affinité sur gélatine-sépharose.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les deux chromatographies d'échange d'ions sont réalisées sur colonnes de DEAE-fractogel^(M) équilibrées avec du tampon comprenant du citrate trisodique 0,01 M, du chlorure de sodium 0,11 M, du chlorure de calcium 0,001 M, de la glucine 0,12 et de la lysine 0,016 M.

3.- Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la fraction cryoprécipitée et prépurifiée de plasma est appliquée sur la première colonne de chromatographie et que le facteur von Willebrand qui s'est adsorbé sur celle-ci est élué par une augmentation de la concentration de chlorure de sodium du tampon à 0,14-0,15 M.

4.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'éluat de la première chromatographie, enrichi en facteur von Willebrand, est appliqué sur la deuxième colonne de chromatographie et que le facteur von Willebrand qui s'est adsorbé sur celle-ci est élué par une augmentation de la concentration de chlorure de sodium du tampon à 0,15-0,17 M.

5.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'éluat de la deuxième chromatographie, enrichi en facteur von Willebrand, est appliqué sur une colonne de chromatographie de gélatine-sépharose équilibrée dans le même tampon que le tampon d'élution précédent et qui adsorbe par affinité sélective la fibronectine résiduelle.

6.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le facteur von Willebrand présent dans le filtrat de la colonne de gélatine-sépharose est récolté, conditionné et lyophilisé.

7.- Concentré de facteur von Willebrand de très grande pureté et à haute activité spécifique (mesurée en unités RCo et CBA) et présentant un taux élevé de multimères de haut poids moléculaire, obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8.- Concentré de facteur von Willebrand selon la revendication 7, caractérisé par un rapport activité (mesuré en unités CBA) sur quantité d'antigène au moins égal à 1,5.

9.- Concentré de facteur von Willebrand selon la revendication 7 ou 8, constitué à plus de 65 à 80 % par des formes multimériques de haut poids moléculaire.

FIGURE 1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

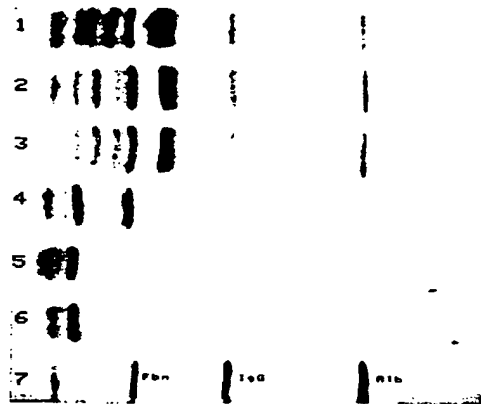
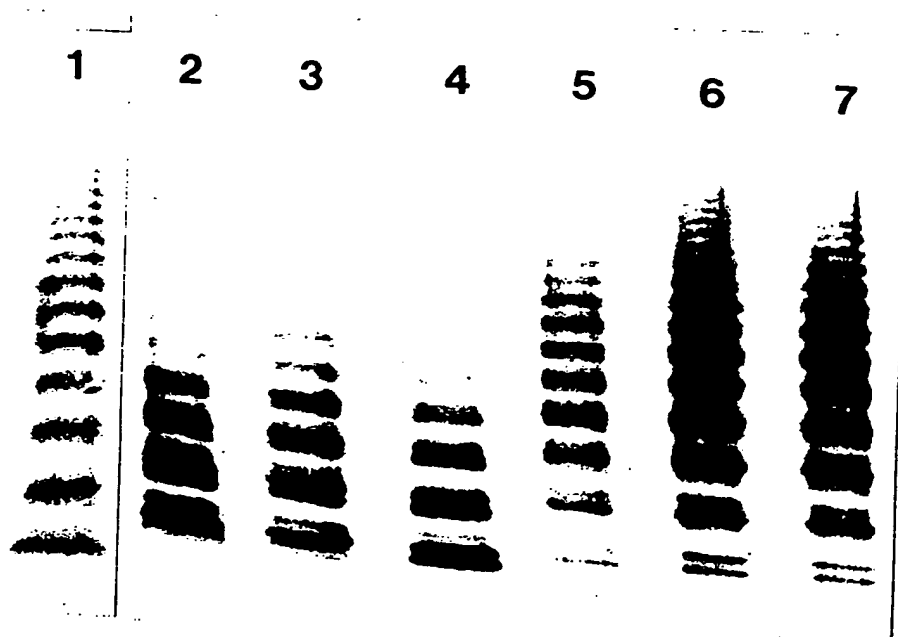


FIGURE 2





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 92 40 0505

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. CLS)
D, Y	EP-A-0 359 593 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) * revendications 1-10, 13; exemples 1, 4 *	1-9	C07K3/28 C07K13/00 //A61K37/02
Y	BIOCHEMISTRY, vol. 25, no. 11, 3 Juin 1986, EASTON, PA US pages 3146 - 3155; M.W. CHOPEK ET AL.: 'HUMAN VON WILLEBRAND FACTOR: A MULTIVALENT PROTEIN COMPOSED OF IDENTICAL SUBUNITS.' * page 3147, colonne de droite, ligne 46 - ligne 50 * * page 3149, colonne de gauche, ligne 59 - colonne de droite, ligne 5 * * page 3153, colonne de droite, ligne 19 - ligne 24 *	1-9	
A	VOX SANGUINIS vol. 60, no. 1, Janvier 1991, BASEL, CH pages 8 - 15; T. BURNOUF ET AL.: 'A HIGHLY PURIFIED FACTOR VIII:c CONCENTRATE PREPARED FROM CRYOPRECIPITATE BY ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY.' * page 9, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, ligne 24 * * page 13, colonne de droite, dernier alinéa - page 14, colonne de gauche, ligne 3 *	1-4	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CLS) C07K A61K
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 19, 10 Mai 1982, Columbus, Ohio, US; abstract no. 158527, T. BURNOUF ET AL.: 'COMBINATION OF GELATIN-CRYODESSICATED AGAROSE FOR THE SELECTIVE EXTRACTION OF HUMAN PLASMA FIBRONECTIN.' page 379 ; * abrégé * & REV. FR. TRANSFUS. IMMUNO-HEMATOL. vol. 24, no. 6, 1981, pages 559 - 570;	1, 5, 6	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 18 JUIN 1992	Examinateur RYCKEBOSCH A.O.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 (1.1) (P0402)